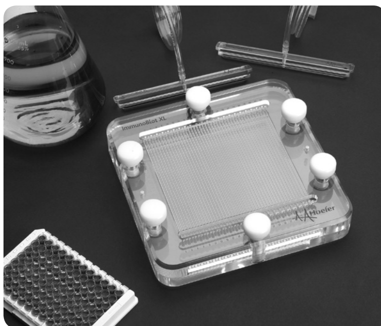
man uale utente
Italiano

ImmunoBlot e ImmunoBlot XL

Istruzioni per l'uso



mu PR645-IM/Italian/Rev.B0/08-12

Hoefer®

Indice

Introduzione

Trasferimento delle proteine o acidi nucleici, frazionato mediante gel elettroforesi, ad una superficie della membrana immobilizzazione aumenta la sensibilità di una vasta gamma di metodi di rilevazione, riduce i tempi di analisi e rende possibile sequenziale sondaggio. In particolare, si è reso possibile utilizzo di procedure immunologiche che non sono pratico per realizzare in un gel. Per materiale test su un foglio di membrana con sonde differenti contemporaneamente richiede comunemente primo taglio della membrana in un numero di strisce parallele. Questa procedura distrugge tuttavia la corrispondenza tra corsie o posizioni diverse su un gel.

Il ImmunoBlot® e ImmunoBlot XL preservare questa corrispondenza, riducendo al minimo il volume dei reagenti di rilevazione necessari per corsie individuali. Due lastre di plastica trasparente, uno liscio e uno con canali e bloccare un 15 × 15 cm della membrana trasferimento definire e separare le corsie gel originali in singoli canali. Questi canali separati consentire l'uso di reagenti di rilevazione diverse (anticorpi primari e secondari coniugati anticorpi, antigeni e/o substrati di reazione) in ogni canale.

Esistono 2 principali applicazioni per la ImmunoBlot e ImmunoBlot XL:

Antisieri multipla o sonde possono essere testati contro un unico campione di proteine o acidi nucleici. Il singolo campione viene caricato attraverso l'intera parte superiore di una lastra di gel, quindi eseguire e cancellati a una membrana. Quando fissato al ImmunoBlot, la membrana può essere testata contro antisieri o sonde multiple.

Un antisiero singolo o sonda può essere testata contro antigeni multipli o acidi nucleici.

I due modelli differiscono nel numero e volume dei canali di reazione. Il ImmunoBlot dispone di 25 canali che tengono un volume massimo di 250 µl ciascuno. Il ImmunoBlot XL dispone di 45 canali che tengono un volume massimo di 140 µl ciascuno.

Disimballaggio e inventario

Scartare tutti i pacchetti con attenzione e comparare i contenuti con la packing list, assicurandosi che tutti gli elementi arrivato. Se una parte manca, rivolgersi all'ufficio vendite locale. Controllare tutti i componenti per i danni che possono essersi verificati mentre l'unità era in transito. Se una parte risulta danneggiata, contattate immediatamente. Essere sicuri di mantenere tutto il materiale di imballaggio per richieste di risarcimento danni o per utilizzare qualora risultasse necessario restituire l'unità.

Istruzioni

Il dettaglio di seguito i passaggi per sondare una membrana utilizzando il ImmunoBlot.

Selezionare e bloccare membrana

❶

Seleziona una membrana di scelta (nitrocellulosa, Hybond ECL™; PVDF, Hybond P; low fluorescent PVDF, Hybond LFP) per il saggio e tagliato a:

Lunghezza: 15 cm

Larghezza: Tagliare per ospitare i canali da utilizzare, larghezza massima per tutti i canali: 15 cm

❷

Membrane Block con eccesso non specifico protein.[1]

❸

Nota: Se membrane bloccati sono stati immagazzinati in una proteina priva di soluzione, loro re-blocco per 1 a 2 minuti in un vassoio di soluzione bloccante.

Caricare membrana

❶

Rimuovere la piastra superiore acrilico del ImmunoBlot e capovolgerlo.

❷

Con l'antigene faccia portante della membrana rivolta verso i canali ImmunoBlot, posizionare la membrana in modo che copra tutto il channels.[2]

❸

Inserire un nuovo pad a secco di tenuta (in dotazione con l'unità) sulla membrana.

❹

Impostare la piastra inferiore dell'unità sulla piastra capovolta superiore modo che i perni di allineamento combaciare.

❺

Assicurarsi che non vi sia spazio tra le piastre superiore e inferiore.

[1] Si veda l'Appendice A, Nota 1, Bloccando la membrana.

[2] Si veda l'Appendice A, Nota 2, Allineamento della membrana.

Raccomandazione: utilizzare una punta di pipetta monouso collegata ad un aspiratore d'acqua a questo scopo.

Importante! Fate attenzione a non toccare la punta della pipetta in qualsiasi punto della unità se non nel foro di campionamento desiderata.

Aspirare e introdurre soluzioni di anticorpi

❶

Aspirare il liquido in eccesso dai canali attraverso i fori numerati.

Nota: per evitare l'essiccamento della membrana, i canali devono essere caricati entro cinque (5) minuti di aspirazione.

❷

Aggiunta della soluzione di anticorpi attraverso i fori numerati.

Premere la punta della pipetta con fermezza in ogni foro e inietta il liquido rapidamente in una singola azione liscio fino a quando il canale è pieno. Fare attenzione a non introdurre bolle d'aria.[3]

❸

Aggiungi tampone a tutti i canali inutilizzati che coprono la membrana.

modello	numero di canali	canale volume approssimativo[4]
ImmunoBlot	25	250 µl
ImmunoBlot XL	45	140 µl

Covare

❶

Posizionare l'unità su una piattaforma oscillante con i canali allineati nella direzione di oscillazione.

Nota: Per ottenere risultati ottimali, utilizzare una bassa velocità a dondolo (da 5 a 6 cicli di inclinazi-one al minuto). Una piattaforma scuotimento rotatorio non è efficace per questo scopo.

❷

Incubare l'unità sulla piattaforma oscillante dai 30 ai 60 minuti a temperatura ambiente.

[3]Si veda l'Appendice A, Nota 3, eliminazione bolle.

[4]Si veda l'Appendice A, Nota 4, volumi ottimali.

Rimuovere soluzioni anticorpo primario e lavare la macchia

Utilizzare il collettore di lavaggio per rimuovere la soluzione di anticorpi e lavare il blot.

❶

Posizionare i 2 parti identiche del collettore di lavaggio nelle fessure su entrambi i lati della piastra superiore e premere fino gli O-ring sono seduti nel slots.[5]

❷

Per aspirare contemporaneamente tutti i campioni, prima collegare pezzi di tubo fornito con l'unità di entrambe le parti del collettore usando un raccordo luer. Ora, collegare l'estremità aperta del tubo dal pezzo collettore di una trappola collegato ad una sorgente di vuoto.

Quindi posizionare l'estremità aperta del tubo dal pezzo secondo collettore in un becher contenente tampone di lavaggio.

Quando si avvia le soluzioni anticorpo vuoto nei canali vengono rimossi e il tampone di lavaggio viene aspirata dal lato. Si prega di fare riferimento al protocollo di rilevamento occidentale per le istruzioni di lavaggio. Per il rilevamento occidentale si consiglia almeno 2 lavaggi rapidi nel buffer seguite da due più lunghi lavaggi nel buffer (5 min, mentre a dondolo è sufficiente) prima di introdurre gli anticorpi secondari.

[5]Si veda l'Appendice A, Nota 5, Montaggio gli O-ring nelle scanalature.

Introdurre anticorpo secondario e incubare

L'incubazione anticorpo secondario può essere eseguita in unità o in un vassoio.[6]

Per eseguire l'incubazione nell'unità ImmunoBlot:

❶

Iniettare la soluzione di anticorpo secondario nei canali accuratamente con una pipetta singola o multi-canale.

❷

Incubare l'unità su una piattaforma oscillante con i canali allineati nella direzione di oscillare per 30 a 60 minuti a temperatura ambiente.

❸

Aspirare la soluzione di anticorpo secondario utilizzando una sorgente di vuoto o pipetta come descritto in precedenza (pagina 5, fase 2) e lavare il blot con tampone di lavaggio per pochi secondi. Lavare la macchia impedisce la contaminazione incrociata dei diversi canali di anticorpi secondari attraverso i canali durante la rimozione della macchia dall'unità.

[6]Si veda l'Appendice A, Nota 6, Incubazione anticorpo secondario.

Rimuovere e sviluppare la macchia

❶

Svitare il ImmunoBlot e separare le due metà.

❷

Eliminare il pad di tenuta utilizzato e lavare la membrana in un vassoio con 3 a 5 cambi di tampone per un totale di 10 a 15 minuti.

❸

Sviluppare la macchia seguendo le istruzioni dal vostro kit per il rilevamento occidentale (vedi anche appendice B).

Pulire il ImmunoBlot

Pulire l'unità accuratamente dopo ogni utilizzo eseguendo le seguenti operazioni:

❶

Sciacquare l'unità ImmunoBlot e collettore di lavaggio sotto l'acqua distillata.

❷

Utilizzare un non abrasiva, agente di pulizia alcalina laboratorio che non lascia residui dopo il risciacquo, quale un detergente destinato pulizia coltura tissutale vetreria. Detergenti concentrati devono essere diluiti alla forza normale.

Raccomandazione: Una soluzione all'1% di soluzione di pulizia 7X (Flow Laboratories, 50 ml di concentrato in 5 litri di acqua calda).

❸

Immergere l'unità ImmunoBlot e collettore di lavaggio in soluzione detergente e spazzola delicatamente con una spazzola morbida facendo attenzione a non graffiare le superfici interne.

Nota: Non sterilizzare in autoclave l'unità ImmunoBlot o collettore di lavaggio.

Non esporre l'unità ImmunoBlot ad alcool o altri solventi organici.

❹

Sciacquare l'unità ImmunoBlot e lavaggio collettore accuratamente con acqua di rubinetto, seguita da acqua distillata.

Per lavare facilmente i piccoli fori numerati, montare l'unità e le unità molteplici senza una membrana e pad di tenuta, e risciacquare con acqua distillata.

Risoluzione dei problemi

problema	possibili cause	raccomandazioni
Perdite – soluzione di anticorpi si è spostata ai canali adiacenti.	Zone aride della membrana agiscono come stoppini per fluidi dalle aree adiacenti.	Sempre pre-bagnato prima di montare la membrana nell'unità. Riempire ogni canale, che copre la membrana con il tampone.
	Membrane non coprire l'intera lunghezza del canale.	Assicurarsi che la membrana viene tagliato a misura corretta.
	Fluido nei canali sovraccariche versato quando l'unità è stata colpita causando la contaminazione dei canali adiacenti.	Non riempire troppo i canali.
	Riutilizzati pastiglie di tenuta non sigillare correttamente.	Non riutilizzare pastiglie di tenuta in quanto comprimono durante l'uso.
	Vassoio di incubazione.	Considerate la vostra incubazione blot con anticorpo secondario nella ImmunoBlot piut-tosto che di incubazione vassoio. (Vedere l'Appendice A:. Nota 6).
	La membrana viene spogliato di bloccare proteine.	Si prega di fare attenzione a non togliere la macchia di bloccare le proteine, mentre il lavaggio prima dell'aggiunta di anticorpi primari. Si prega di seguire le istruzioni dal vostro kit occidentale rilevamento blotting. Un protocollo campione è dato in Appendice B.
	Canali non lavate conteneva anticorpi che ha contaminato l'esperimento.	Pulire l'unità dopo ogni uso. Per i consigli per la pulizia, vedere la sezione Clean ImmunoBlot, a pagina 7.
Sensibilità bassa	Quando bassa affinità o anticorpi basso titolo sono utilizzati in diluizione elevata (1:100.000 o superiore), una certa diminuzione di intensità del segnale può essere osservato. Gli anticorpi possono essere impoverito in piccolo volume del canale ImmunoBlot.	Aumentare la concentrazione di anticorpi piega 2-5. Aumentare il volume di soluzione di anticorpi per canale. Per fare questo, inserire standard 200 µl puntali di plastica in entrambe le porte d'ingresso per ogni canale. Questi fungono da serbatoi per i volumi di campione più grande del volume del canale stesso, mentre incubazi-one a bilanciere. Iniettare il campione degli anticorpi con una punta che rimane poi nella porta di ingresso e diventa un tale serbatoio. Eseguire le incubazioni anticorpo secondario in un vassoio. (Vedere l'Appendice A, Nota 6).

problema	possibili cause	raccomandazioni
Bolle (Nota: Piccole bolle in genere muovono quando l'unità è scosso e di solito non influisce sui risultati)	Le soluzioni erano troppo freddo. Gas disciolto emerge dalla soluzione al crescere della temperatura.	Portare le soluzioni a temperatura ambiente prima di caricare i campioni.
	Canali contenuti residue gocce di liquido prima che i campioni sono stati caricati.	Inclinare l'unità e liquido aspirato dalla estremità inferiore di ciascun canale con una pipetta di plastica attaccato ad una forte depressione.
	Tecnica di pipettamento improprio è stato utilizzato.	Sedile il puntale saldamente nel foro e numerato erogare il campione con una sola azione liscia.
	Pastiglie di tenuta erano umidi prima del montaggio.	Assicurarsi che gli elettrodi di saldatura siano asciutti prima di montarli sul ImmunobBlot.
	Scarsa qualità o una pipetta scarsa manutenzione introdotto bolle nei canali.	Prova a iniettare campioni con una pipetta o una marca di punta.
	Bolle formata nel tempo.	Mettere uno strato di pellicola trasparente tra la membrana e il pad di tenuta.
Collettore è difficile da inserire.	O-ring potrebbe essere necessario lubrificazione o sostituzione.	Per lubrificare: • Rimuovere gli O-ring accurata-mente con la punta di una spatola piatta pesatura. • Applicare grasso al silicone leggera. • Reinstallare.

Appendice A: note tecniche

Nota 1: Blocco della membrana

Le membrane devono sempre essere bloccato prima di montare in ImmunoBlot. Si prega di seguire le istruzioni per il blocco, previsto nel kit di rilevamento occidentale blotting.

Generalmente, 5% di latte non grasso secco o 5% BSA sono usati come agenti bloccanti.

Blocco con detergenti Tween-20 o un altro sole, non è raccomandato in quanto potrebbe causare una lenta diffusione laterale delle proteine attraverso la membrana di nitrocellulosa. È consigliabile eseguire la fase iniziale di blocco in una soluzione contenente proteina (per esempio, 5% BSA) senza detergente. Evitare lavaggi estese con soluzioni contenenti nessuna proteina prima di montare la membrana nel ImmunoBlot.

In molti casi, blocco soddisfacenti può essere ottenuto mediante incubazione con PBS/10% vitello neonato serum/0.1% Tween-20 per un minimo di un'ora a temperatura ambiente. Tuttavia, agenti bloccanti differiscono nella loro efficacia a seconda delle circostanze. Per blot di lisati di cellule intere, blocco 50 o il 100% di siero può essere molto efficace nel ridurre il legame non specifico.

Nota 2: Allineare la membrana

Per esperimenti di Western blotting è importante che le corsie e bande di proteine sulla membrana allineati con i canali dell'unità ImmunoBlot. Questo può essere realizzato in 2 fasi:

Passo 1.

Utilizzare la appositamente progettati ImmunoBlot pettini al momento di elettroforesi. Questo assicura che le corsie sul gel e, successivamente, le corsie e le bande proteiche sul blot, sono allineati con i canali sul ImmunoBlot.

Combs con spaziature e che corrispondono le distanze corsia delle unità ImmunoBlot sono elencati di seguito. Si prega di notare che il numero di pozzi non sempre corrisponde al numero di corsie in un rapporto di 1:1.

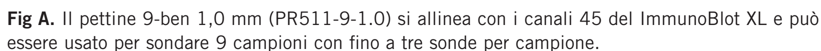


Fig A. Il pettine 9-ben 1,0 mm (PR511-9-1.0) si allinea con i canali 45 del ImmunoBlot XL e può essere usato per sondare 9 campioni con fino a tre sonde per campione.

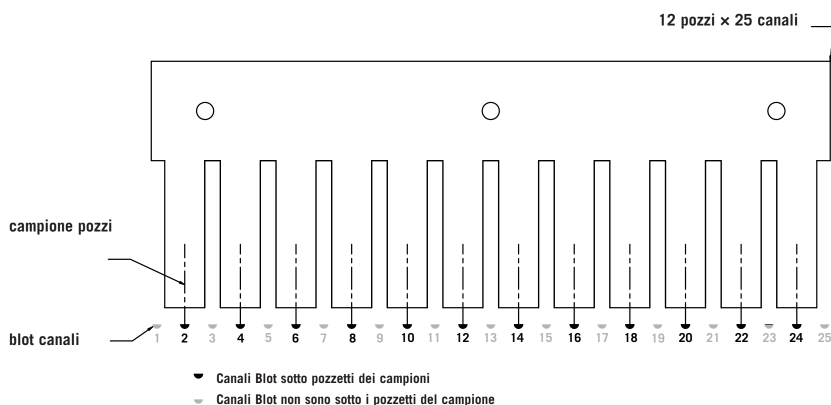


Fig B. 12-ben 1,0-mm pettine (PR511-12-1.0) si allinea con i canali 25 del ImmunoBlot e può essere usato per sondare 12 campioni con una sonda per campione.

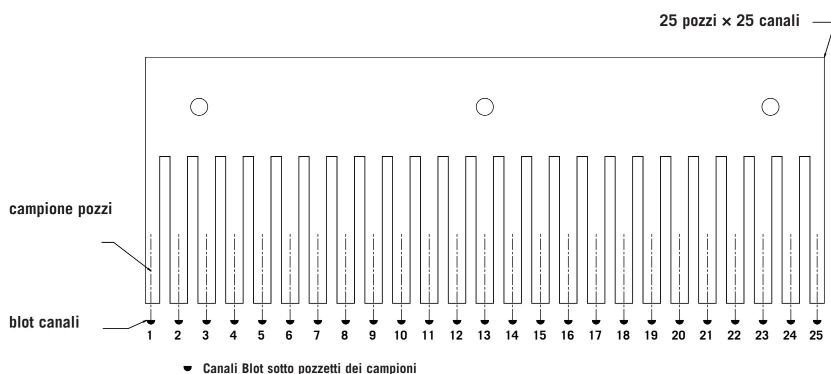


Fig C. 25-ben 1,0 mm pettine (PR511-25-1.0) allinea anche con i canali 25 del ImmunoBlot e può essere usato per sondare 25 campioni con una sonda per campione.

Passo 2.

Dopo che i gel sono cancellati, le bande sulla membrana non sono visibili. Aggiunta di un colorante reattivo non renderà facile allineare la membrana. Ciò può essere fatto in due modi:

A. Per carichi proteina più grande (>250 ng) Ponceau S può essere utilizzato per colorare le proteine reversibilmente sulla membrana successivo trasferimento elettroforetico.

Sciacquare la membrana brevemente in acqua e macchia nello 0,2% Ponceau S per 1 o 2 minuti, quindi Decolorare in diversi cambiamenti di acqua distillata fino a bande rosse appaiono su uno sfondo bianco. Poiché la macchia viene perso durante la successiva fase di bloccaggio, bande proteiche devono essere marcati in questa fase con fori o con una matita appuntita. La macchia può anche essere fotocopiata.

Ponceau S macchie colorate possono essere conservati per mesi a 4 °C, mantenuto umido tra fogli di carta parafilm o buffer saturo filtro. Macchie possono anche essere congelati in un sacchetto di plastica.

Polvere Ponceau S deve essere sciolto in acqua distillata per ottenere una soluzione di lavoro. La soluzione può essere riutilizzato per diverse settimane o mesi a seconda del numero di macchiato membrane.

B. Per carichi proteico inferiore (<250 ng), verde di metile, pironina Y o viola profondi possono essere usati per marcare in modo permanente alla parte superiore e inferiore del gel per successivo allineamento con i canali ImmunoBlot.

Quando si carica il gel, aggiungere circa 5 µl di metile verde (0,1% soluzione in 50% glicerolo) o pironina Y (0,05% in soluzione 50% glicerolo) alle corsie desiderati. Questi coloranti migrare appena prima del fronte di colorante blu di bromofenolo in gel, e trasferirà in modo permanente alla membrana. Una seconda aliquota del colorante aggiunto al gel vicino alla fine della corsa elettroforetica entrerà nel gel risolvere in 5 a 10 minuti e servono per segnare l'inizio del gel. Si prega di tenere presente che questi coloranti fluorescenti possono interferire con i metodi occidentali di rilevazione blotting e deve quindi essere rimossa prima di imaging. Se lasciato sulla membrana che si tradurrà in segnali non specifici in fluorescente rilevamento Western blotting.

Nota 3. Eliminare le bolle

Piccole bolle nei canali generalmente non influenzare la reazione finale, e dovrebbe muoversi avanti e indietro sulla superficie della membrana quando il ImmunoBlot viene agitata. Per eliminare bolle grandi, prelevare la soluzione dal canale e ri-iniettare. Per ulteriori informazioni, consultare la sezione Risoluzione dei problemi.

Nota 4. Volumi ottimali

Il volume ottimale per i canali ImmunoBlot varierà leggermente a seconda del tipo di membrana impiegata. La soluzione aggiunta dovrebbe quasi (95%) riempire l'intero canale. Ridurre il volume se la soluzione si riversa fuori della porta di ingresso quando l'unità è incubato su una piattaforma oscillante.

Nota 5. Montaggio delle O-ring nelle scanalature

Se i molteplici unità di lavaggio non si adattano con facilità nelle fessure, applicare una piccola quantità di grasso al silicone intorno agli O-ring. Posizionare il gruppo collettore liberamente nella fessura e premere verso il basso sul lato del collettore verso di voi. Quindi premere sul lato lontano dalla sede di collettore saldamente nella scanalatura.

Nota 6. Incubazioni anticorpo secondario

Nota: Fare attenzione quando si eseguono incubazioni cassetto perché gli anticorpi monoclonali a bassa affinità si può dissociare dai loro rispettivi antigeni nel corso del tempo. L'incubazione in un vassoio consente di tali anticorpi per diffondere attraverso la soluzione di incubazione e riassociare altrove sul blot. Tale striature è rilevabile come macchie tra corsie campione o in corsie di controllo negativo in corrispondenza della posizione di uno o più gruppi fortemente reattivi.

Si prega di seguire le istruzioni fornite con il sistema occidentale di rilevamento blotting. Quando l'anticorpo secondario viene utilizzato nel ImmunoBlot ad una diluizione elevata (1:100.000 o maggiore), una certa diminuzione dell'intensità del segnale può essere osservato. Ciò può essere dovuto a deplezione di anticorpi nel piccolo volume del canale. Il problema può essere generalmente corretta da:

1. Aumentando la concentrazione anticorpale 2-5 volte
2. Aumentando il volume anticorpo, o
3. Rimuovere la membrana dall'unità ed eseguendo l'incubazione anticorpo secondario in un vassoio.

Appendice B: rilevamento utilizzando ECL sistemi occidentali di rilevamento blotting

Hoefer raccomanda di eseguire l'etichettatura e la rilevazione sulle macchine seguendo le istruzioni fornite nella etichettatura Western blotting e kit per il rilevamento. Di seguito è riportato un protocollo generale in base al GE Healthcare (già Amersham Biosciences) ECL Kit occidentale Blotting Detection.

Ci sono diversi sistemi occidentali di rilevazione ECL blotting disponibili.

Il seguente protocollo generale si consiglia:

❶

Dopo l'elettroforesi e trasferimento di proteine separate su nitrocellulosa o PVDF (basso Hybond LFP fluorescenti per la massima sensibilità) della membrana, bloccare i siti aspecifici con una soluzione adeguata di blocco.

❷

Blocco è seguita da due lavaggi in rapidi PBS/0.1% Tween (PBS-T).

❸

Immergere e incubare la membrana con un anticorpo antigene-specifico primario di concentrazione ottimizzato.

❹

Rimuovere la membrana con due lavaggi rapidi di PBS-T seguita da 2 lavaggi più lunghi (2 × 5 min a dondolo).

❺

Incubare la membrana con una concentrazione ottimale di anticorpo secondario coniugato.

❻

Brevemente sciacquare la membrana con due cambi di tampone di lavaggio seguita da 4 lavaggi più in PBS-T (4 × 5 min a dondolo).

❼

Detection soluzione A e B sono miscelati e pipettati sulla membrana per una breve incubazione.

❽

Drenare eccesso di reagente di rilevamento e avvolgere la membrana in Saran Wrap-prima dell’esposizione ai raggi X film.

Informazioni per l'ordine

prodotto	quantità	codice
ImmunoBlot, per l'uso con gel di dimensioni standard di membrana (ad esempio SE600). 25 corsie sonda distanziati 5,3 millimetri distanza. Include piastra superiore, piastra inferiore, 2 viti, collettore di lavaggio (2 pezzi), 2 pezzi di tubi, raccordi tubi, e 5 pastiglie di tenuta.	1	PR625
ImmunoBlot XL, per l'utilizzo con lo standard membrana gel imprese (ad es SE600). 45 corsie sonda distanziati 3,0 millimetri di distanza. Include piastra superiore, piastra inferiore, 2 viti, collettore di lavaggio (2 pezzi), 2 pezzi di tubi, raccordi tubi, e 5 pastiglie di tenuta.	1	PR645
Pastiglie di tenuta di plastica	10	PR630-31
Lavaggio Kit Collettore	1	PR630-32
O-ring	2	PR630-33
Collettore connettori Luer	4	PR630-34
Vite di serraggio	1	PR630-36
Pannello superiore per PR625	1	PR625T
Pannello superiore per PR645	1	PR645T
Piastra di fondo	1	PR630-37
Pettine, 9 pozzi 1,0 mm	1	PR511-9-1.0
Pettine, 12 pozzi 1,0 mm	1	PR511-12-1.0
Pettine, 25 pozzi 1,0 mm	1	PR511-25-1.0

Hoefer, Inc.
84 October Hill Road
Holliston, MA 01746

Numero verde: 1-800-227-4750
Telefono: 1-508-893-8999
Fax: 1-508-893-0176
E-mail: support@hoeferinc.com
Web: www.hoeferinc.com

Stampato negli USA.

